家蚕吡哆醛激酶基因定点突变及突变体功能

舒　婷[1]，张剑韵[2]，黄龙全[1,*]
(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院，合肥 230036；2. 安徽农业大学生命科学学院，合肥 230036)

摘要：【目的】吡哆醛激酶(pyridoxal kinase, PLK)是维生素 B_6 关键代谢酶。前期研究克隆出家蚕 *Bombyx mori* 吡哆醛激酶 cDNA，经序列比对发现几个重要且保守的氨基酸残基在此蛋白中被替换。为明确家蚕吡哆醛激酶分子若干特定位置上氨基酸残基在酶功能上的作用进行本研究。【方法】采用重叠延伸法对家蚕吡哆醛激酶 Thr^{47}, Asn^{121}, Ile^{54}, Arg^{88} 和 Trp^{230} 氨基酸残基进行定点突变，构建表达载体 pET-22b(+)-PLK 并转入大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta 中进行诱导表达，经亲和层析对重组蛋白进行纯化，通过酶活性检测进行功能鉴定。【结果】家蚕吡哆醛激酶 Thr^{47}, Ile^{54} 和 Arg^{88} 氨基酸突变后酶的催化活力分别下降 82%, 58% 和 85%；Asn^{121} 突变对酶的催化活力几乎没有影响；而 Trp^{230} 突变导致酶丧失催化活性。【结论】本研究明确了选定氨基酸侧链基团在家蚕吡哆醛激酶催化功能上的意义。

关键词：家蚕；吡哆醛激酶；定点突变；表达；纯化；功能鉴定；酶活性
中图分类号：Q966　**文献标识码**：A　**文章编号**：0454-6296(2011)09-0969-06

Site-directed mutation of pyridoxal kinase gene and the function of the mutants in the silkworm, *Bombyx mori*

SHU Ting[1], ZHANG Jian-Yun[2], HUANG Long-Quan[1,*] (1. College of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract:【Aim】Pyridoxal kinase (PLK) is a key enzyme related to VB_6 metabolism. In the previous study, the cDNA of PLK of the silkworm, *Bombyx mori*, was cloned, and several important and conservative amino acid residues were replaced in this protein by sequence alignment. This study aims to identify the effect of amino acid residues at specific position of PLK of *B. mori* on enzyme function.【Methods】The conserved sites Thr^{47}, Asn^{121}, Ile^{54}, Arg^{88} and Trp^{230} were site-mutated respectively by using over-lap extension. The expression plasmid pET-22b(+)-PLK was constructed and transformed to *Escherichia coli* Rosetta for induction and expression, and then the function of the recombinant protein was analyzed after expression product was purified using affinity chromatography.【Results】Compared with the wild type PLK, the PLK activities of the mutantions Thr^{47}, Ile^{54} and Arg^{88} were reduced by 82%, 58% and 85%, respectively, while the PLK activity of the mutantion Asn^{121} was hardly affected and the PLK activity of the mutantion Trp^{230} vanished.【Conclusion】In this study, the significance of selected amino acid residues of side chains on the catalytic function of PLK of *B. mori* was clarified.

Key words: *Bombyx mori*; pyridoxal kinase; site-directed mutation; expression; purification; functional identification; enzyme activity

维生素 B_6(VB_6)是一组吡啶类化合物的总称，基本型有吡哆醇(pyridoxine, PN)、吡哆胺(pyridoxamine, PM)和吡哆醛(pyridoxal, PL)，相应的磷酸酯型为磷酸吡哆醇(pyridoxine 5′-phosphate, PNP)、磷酸吡哆胺(pyridoxamine 5′-phosphate, PMP)和磷酸吡哆醛(pyridoxal 5′-phosphate, PLP)(Snell *et al*., 1942)。其中，PLP 是 100 多种细胞酶的辅酶，涉及氨基酸代谢的各种反应和其他多种代谢过程(McCormick and Chen, 1999)。植物和微生物拥有 VB_6 从头合成途径(*de novo* pathway)。动物利用食物中的 VB_6 通过补救途径(salvage pathway)合成 PLP。补救途径由吡哆醛激酶(pyridoxal

基金项目：国家自然科学基金项目(30870338)
作者简介：舒婷，女，1985 年生，浙江衢州人，硕士研究生，研究方向为食品科学，E-mail：shutingonly813@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：lqhuang218@yahoo.com.cn
收稿日期 Received：2011-03-30；接受日期 Accepted：2011-06-17

kinase，PLK，EC 2.7.1.35）和 PNP/PMP 氧化酶（PNP/PMP oxidase，EC 1.4.3.5）构成，前者催化游离型 VB_6 的磷酸化反应，生成相应的磷酸酯型，后者将 PNP 或 PMP 转变为 PLP（Kwok and Churchich，1980）。

哺乳动物、植物和微生物 PLK 的酶学性质、化学修饰和空间结构等多有报道（Maras *et al*.，1999；Lum *et al*.，2002；Li *et al*.，2004；Cao *et al*.，2006；Safo *et al*.，2006；Kästner *et al*.，2007；Shi *et al*.，2007），而昆虫 PLK 的相关研究很少。目前尚没有关于 PLK 定点突变的研究报道。家蚕 *Bombyx mori* 是用于蚕丝生产的重要经济昆虫，VB_6 对蚕体氨基酸代谢、脂肪酸代谢以及转氨酶活力有较大影响（张剑韵和黄龙全，2003a）。家蚕虽然同属 VB_6 异养型生物，但家蚕体内 VB_6 代谢和哺乳动物存在差异（张剑韵和黄龙全，2003b）。家蚕 PLK cDNA 含有一 894 bp 的完整可读框，编码一条分子量为33.1 kDa，含 298 个氨基酸残基的蛋白质。此蛋白质与人 PLK 序列的同一性为 50%，包含 PL 激酶家族共有的特征保守序列，但比哺乳动物和植物 PLK 均少 10 多个残基，4 个重要且保守的氨基酸残基在此蛋白中被替换（Shi *et al*.，2007）。定点突变是分析酶分子上特定位置的氨基酸残基在酶的结构与功能上作用的有效方法。本文以本研究室克隆的家蚕 PLK cDNA（GenBank 登录号：ABE28378）为研究对象，对家蚕 PLK 几个有特点的氨基酸残基 Thr^{47}，Ile^{54}，Asn^{121}，Arg^{88} 和 Trp^{230} 进行定点突变，构建重组质粒进行原核表达，对纯化后的重组蛋白进行酶活性测定，明确了选定氨基酸侧链基团在酶功能上的意义。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 克隆菌株、质粒 pET-22b(+)由安徽农业大学茶叶生物技术重点实验室保存。*E. coli* Rosetta（DE3）表达菌株购自北京全式金生物技术有限公司；限制性内切酶 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ、T4 连接酶、DNA marker 和胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司；Pfu 聚合酶、Taq DNA 聚合酶和 dNTP 购自北京全式金生物技术有限公司；异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）、二硫苏糖醇（DTT）、苯甲基磺酰氟（PMSF）、溶菌酶、氨苄青霉素钠（Amp-Na_2）、氯霉素（CM）和三磷酸腺苷钠盐（ATP-Na_2）购自上海生工生物工程公司；Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 购自 GE 公司；离心超滤管购自 Millipore 公司；蛋白质 Marker 购自天根生物技术有限公司；PL 购自 Sigma 公司；引物合成与核酸序列分析分别由上海生工公司和南京英骏公司完成。

1.2 定点突变

采用重叠延伸法（overlap extension）（韦朝领等，2004）分别将家蚕 PLK 47 位苏氨酸 Thr^{47}（T）突变为天冬酰胺（N），记作 T-N；54 位异亮氨酸 Ile^{54}（I）突变为苯丙氨酸（F），记作 I-F；88 位精氨酸 Arg^{88}（R）突变为异亮氨酸（I），记作 R-I；121 位天冬氨酸 Asn^{121}（N）突变为谷氨酸（E），记作 N-E；230 位色氨酸 Trp^{230}（W）突变为谷氨酸（E），记作 W-E。依据家蚕 PLK cDNA 编码框序列，分别设计 2 条引物 T-F 和 T-R 用于各突变。

依据家蚕 PLK cDNA 编码框序列，设计 2 条引物 P_{PLK}-F 和 P_{PLK}-R 用于构建 PLK pET22b 融合蛋白表达载体（表 1）。

以 P_{PLK}-F 和 T-F 分别作上、下游引物，PCR 扩增反应条件根据 Pfu DNA 聚合酶使用说明设定为：94℃预变性 3 min，94℃变性 30 s，57℃退火 30 s，72℃延伸 90 s，35 个循环后，72℃补齐 10 min，所得产物用 DNA 凝胶纯化试剂盒回收，记为 T-AC。以 P_{PLK}-R 和 T-R 分别作上、下游引物，用同样的方法得到的扩增产物记为 T-BD。琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物。

再以 P_{PLK}-F 和 P_{PLK}-R 分别为上、下游引物，以 T-AC 和 T-BD 模板链进行扩增，反应条件为：94℃预变性 3 min，94℃变性 30 s，72℃延伸 90 s，20 个循环后，再 72℃补齐 10 min，随后加入引物 P_{PLK}-F 和 P_{PLK}-R，94℃预变性 3 min 后，94℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 90 s 进行 35 个循环后，72℃补齐 10 min。琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物。突变产物命名为 $F_{PLK\text{-}T}$，送南京英骏公司测序。采用所述相同的方法分别获得突变产物 $F_{PLK\text{-}I}$，$F_{PLK\text{-}R}$，$F_{PLK\text{-}N}$ 和 $F_{PLK\text{-}W}$。

1.3 重组表达载体的构建

将扩增所得到的突变体片段的末端加 A 尾，连接入 pMD18-T 载体中，转入 *E. coli* DH5α 中，菌落 PCR 鉴定阳性菌。将已确认的 pMD18-T 重组质粒用 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切，纯化回收目的基因，并将其与同样双酶切后的 pET-22b 连接，得到重组表达载体，记为 pET-22b(+)-$M_{PLK\text{-}T}$。将 pET-22b(+)-$M_{PLK\text{-}T}$ 转入 *E. coli* Rosetta 中，菌落 PCR 鉴定

表 1　本研究中所用引物
Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence（5′-3′）	引物的功能 Function of primers
T-F	TATGCTGTGTCGTTTGAAAACTGTA	Thr[47]突变引物 Thr[47] mutation
T-R	TGTACAGTTTTCAAACCACACAGCA	
I-F	TAGCCCTTGAAATGCTTGTATGCTG	Ile[54]突变引物 Ile[54] mutation
I-R	CAAGCATTTCAAGGGCTATGTATT	
R-F	TGGCGATATTGAGTAACCAGTTAGG	Arg[88]突变引物 Arg[88] mutation
R-R	GGTTACTCAATATCGCCAGATTCTC	
N-F	TTTTTCCCTCATCACCCATCACCG	Asn[121]突变引物 Asn[121] mutation
N-R	ATGGGTGATGAGGGAAAAATGTACG	
W-F	AAGTGTGACTCCGCGAGGAATAACG	Trp[230]突变引物 Trp[230] mutation
W-R	TATTCCTCGCGGAGTCACACTTGAC	
P_{PLK}-F	GGCCATATGTCTCAAGATGATACTCCA	PLK 扩增 PLK amplification
P_{PLK}-R	GTCTCTCGAGGTTTATTTTCACAGCCTT	

对于突变引物，阴影部分为突变的氨基酸密码子 The codon of mutated amino acid is shaded in primer sequences used in mutation. 对于 PLK 扩增引物，阴影部分为限制性酶切位点 The restriction site is shaded in primer sequences used in PLK amplification.

阳性菌，并送南京英骏公司测序。以同样的方法得到 pET-22b（+）-M_{PLK-I}，pET-22bM_{PLK-R}，pET-22b（+）-M_{PLK-N}和 pET-22b（+）-M_{PLK-W}。

1.4　重组蛋白的的诱导表达和纯化

把含有重组质粒的 *E. coli* Rosetta 分别接种于 10 mL 含氨苄青霉素（50 μg/mL）和氯霉素（34 μg/mL）的 LB 液体培养基中，37℃震荡培养过夜，以 1∶100（v/v）进行扩大培养，培养至菌液 OD_{600}值为 0.4～0.6 时，加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 进行诱导表达，16℃培养过夜后离心收集菌体。加入 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液（pH 7.4）5 mL 重悬菌体，添加终浓度 1 mmol/L DTT，10 mmol/L PMSF，100 μg/mL 溶菌酶后混匀。冰浴下超声破碎菌体，4℃下 8 000 rpm 离心 20 min，所得上清即为粗酶液。粗酶液经 Ni Sepharose™ 6 Fast Flow（GE）分离和纯化，收集目的蛋白进行超滤浓缩（张平平等，2010）。取 10 μL 样品进行 SDS-PAGE 电泳（浓缩胶 5%、分离胶 12.5%）检测蛋白纯度，采用 Bradford 法检测蛋白浓度。

1.5　家蚕 PLK 的活性检测

采用苯肼法检测家蚕 PLK 活性（Wada and Snell，1961）。酶活力单位（U）定义：37℃下，每分钟催化生成 1 nmol PLP 所需的酶量。反应总体系为 3 mL，80 mmol/L 磷酸缓冲液（pH 5.5）2.420 mL，10 mmol/L 的 ATP 100 μL，3 mmol/L 的 $ZnCl_2$ 50 μL 和纯化后的 PLK 20 μg。反应体系 37℃下预热 5 min 后添加 PL 开始反应，反应时间 10 min。加入 300 μL 三氯乙酸（TCA）中止反应。离心取上清 2 mL，加入磷酸缓冲液 850 μL 和苯肼试剂 150 μL 后反应 2.5 min，410 nm 下测定吸光度。对照为先加入 TCA，后加入 PL。

2　结果与分析

2.1　定点突变体的获得

图 1 为琼脂糖凝胶电泳分析结果。对 T-N 突变来说，第 1 次扩增得到 2 条片段，以 P_{PLK}-F 和 T-F 分别作上、下游引物，PCR 得到的扩增产物 T-AC，约为 150 bp；以 P_{PLK}-R 和 T-R 分别作上、下游引物，PCR 得到的扩增产物 T-BD，约为 750 bp；第 2 轮扩增得到 1 条片段为突变产物 F_{PLK-T}，约 900 bp。同样，I-F 突变：I-AC 约为 160 bp，I-BD 约为 740 bp；R-I 突变：R-AC 约为 260 bp，R-BD 约为 640 bp；N-E 突变：N-AC 约为 360 bp，N-BD 约为 540 bp；W-E 突变：W-AC 约为 690 bp，W-BD 约为 210 bp；第 2 轮扩增突变产物 F_{PLK-I}，F_{PLK-R}，F_{PLK-N}和 F_{PLK-W}均为 900 bp（图 2）。测序结果也与试验设计一致，说明突变成功。

2.2　重组表达载体的构建

用 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切重组表达载体 pET-22b（+）-M_{PLK-T}，1.2% 琼脂糖凝胶电泳结果为图 3。质粒测序结果证明重组表达载体 pET-22b（+）-

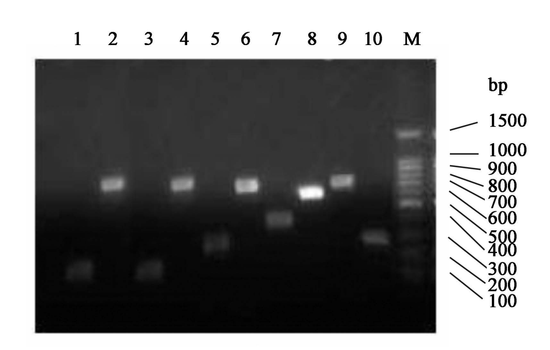


图 1 家蚕 PLK 定点突变片段的鉴定

Fig. 1 Identification of site-directed mutant DNA fragments of PLK in *Bombyx mori*

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1: 以 P_{PLK}-F 和 T-F 分别作上、下游引物, PCR 得到的扩增产物 PCR products amplified with primers P_{PLK}-F and T-F; 2: 以 P_{PLK}-R 和 T-R 分别作上、下游引物, PCR 得到的扩增产物 PCR products amplified with primers P_{PLK}-R and T-R; 3: 以 P_{PLK}-F 和 I-F 分别作上、下游引物, PCR 得到的扩增产物 PCR products amplified with primers P_{PLK}-F and I-F ; 4: 以 P_{PLK}-R 和 I-R 分别作上、下游引物, PCR 得到的扩增产物 PCR products amplified with primers P_{PLK}-R and I-R; 5: 以 P_{PLK}-F 和 R-F 分别作上、下游引物, PCR 得到的扩增产物 PCR products amplified with primers P_{PLK}-F and R-F; 6: 以 P_{PLK}-R 和 R-R 分别作上、下游引物, PCR 得到的扩增产物 PCR products amplified with primers P_{PLK}-R and R-R; 7: 以 P_{PLK}-F 和 N-F 分别作上、下游引物, PCR 得到的扩增产物 PCR products amplified with primers P_{PLK}-F and N-F; 8: 以 P_{PLK}-R 和 N-R 分别作上、下游引物, PCR 得到的扩增产物 PCR products amplified with primers P_{PLK}-R and N-R; 9: 以 P_{PLK}-F 和 W-F 分别作上、下游引物, PCR 得到的扩增产物 PCR products amplified with primers P_{PLK}-F and W-F; 10: 以 P_{PLK}-R 和 W-R 分别作上、下游引物, PCR 得到的扩增产物 PCR products amplified with primers P_{PLK}-R and W-R.

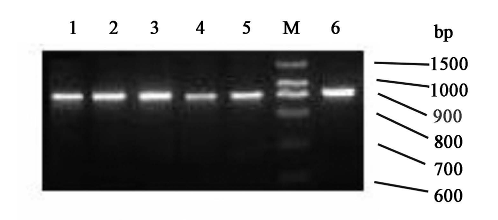


图 2 家蚕 PLK 基因编码区全长片段的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of the coding region of PLK of *Bombyx mori*

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1: 突变体 F_{PLK-T} Mutated F_{PLK-T}; 2: 突变体 F_{PLK-I} Mutated F_{PLK-I}; 3: 突变体 F_{PLK-R} Mutated F_{PLK-R}; 4: 突变体 F_{PLK-N} Mutated F_{PLK-N}; 5: 突变体 F_{PLK-W} Mutated F_{PLK-W}; 6: 野生型 PLK Wild type PLK.

M_{PLK-T} 构建成功。pET-22b(+)-M_{PLK-I}, pET-22b(+)-M_{PLK-R}, pET-22b(+)-M_{PLK-N} 和 pET-22b(+)-M_{PLK-W} 也用同样的方法进行了验证。

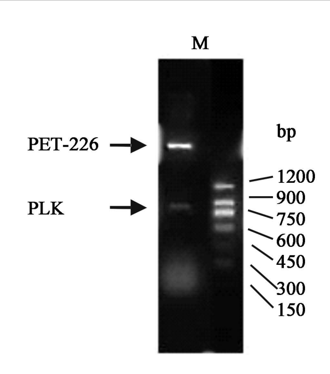


图 3 家蚕 PLK 重组表达质粒 pET-22b(+)-M_{PLK-T} 的双酶切鉴定

Fig. 3 Double enzyme digestion of recombinant vector pET-22b(+)-M_{PLK-T} in *Bombyx mori*

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker.

2.3 重组蛋白的诱导表达

经 SDS-PAGE 检测, 野生型家蚕重组 PLK 蛋白分子量约为 33 kDa。突变重组家蚕 PLK 的分子量也都约为 33 kDa(图 4)。

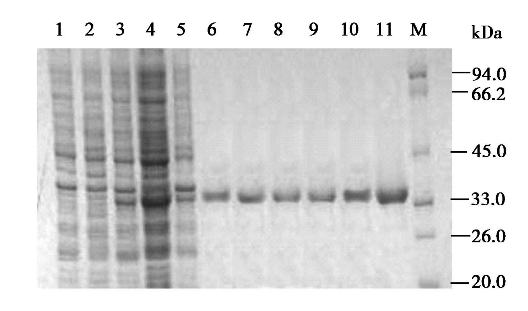


图 4 家蚕重组野生型和突变 PLK 的原核表达和鉴定

Fig. 4 Expression of wild type and mutated recombinant PLK of *Bombyx mori*

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight standard; 1: pET-22b 空载体诱导 Empty vector pET-22b(+)- after induction; 2: 无 IPTG 诱导条件下 pET-22b(+)-PLK 的表达 Expression of pET-22b(+)-PLK without IPTG; 3: IPTG 诱导条件下 pET-22b(+)-PLK 的表达 Expression of pET-22b(+)-PLK after induction with IPTG; 4-5: 分别为超声后的菌液上清和沉淀 Supernatant and deposit of bacterial liquid after ultrasonication, respectively; 6-11: 纯化后的 PLK, PLK-T, PLK-I, PLK-R, PLK-N, PLK-W 蛋白 Purified recombinant protein.

2.4 家蚕 PLK 的活性分析

家蚕野生型 PLK 反应产物经苯肼反应后在 410 nm 下的 OD 值为 0.86, 同样条件下测得突变体 PLK-T, PLK-I, PLK-R, PLK-N 和 PLK-W 的 OD 值分别为 0.16±0.02, 0.37±0.02, 0.13±0.01, 0.77±0.02, 0.02±0.00。野生型家蚕 PLK 酶活力为 360 U/mL, PLK-T, PLK-I, PLK-N, PLK-R 和 PLK-W 突变体的酶活力分别为 64.8, 151.2, 321.3, 54 和 5.5 U/mL(图 5)。结果表示: 家蚕 PLK

Thr^{47}，Ile^{54}和 Arg^{88}氨基酸突变后催化活力分别下降 82%，58% 和 85%；Asn^{121}突变对催化活力几乎没有影响；而 Trp^{230}突变导致酶丧失催化活性。

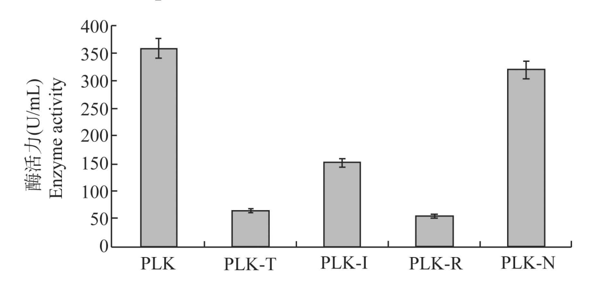


图 5　家蚕重组野生型和突变 PLK 的功能鉴定

Fig. 5　The functional identification of wild-type and mutated recombinant PLK of *Bombyx mori*

3　讨论

3.1　突变体 PLK-T 功能分析

Li 等(2004)对羊脑 PLK 晶体结构的研究发现，酶与 PL 结合时，重要的 Loop Ⅱ结构向 PL 移动 2Å；Loop Ⅱ上的 Val^{41}，Phe^{43}和 Thr^{47}把 PL 拉向 ATP，同时 Tyr^{84}，Tyr^{127}，His^{46}，Val^{231}和 Val^{115}朝 PL 的嘌呤环两侧移动，固定 PL。

本研究通过序列比对发现 Thr^{47}是家蚕 PLK Loop Ⅱ区域内的氨基酸。家蚕 PLK 的 Thr^{47}可能是结合 PL 重要的氨基酸残基。苏氨酸突变为天冬酰胺后，突变体的催化活性大幅度降低，说明 Thr^{47}是对家蚕 PLK 的催化功能有重要意义。Thr 属于含羟基的氨基酸，突变后的 Asn 是酸性氨基酸，Loop Ⅱ结构微环境的酸碱性发生改变，导致环结构不能很好地固定 PL。另一方面，Thr 的羟基可能与 PL 的 O_3 以氢键结合，辅助 Thr^{49}结合 PL。突变后的家蚕 PL 激酶不能与 PL 的 O_3 很好结合。

3.2　突变体 PLK-I 功能分析

羊脑 PLK-ATP 复合体结合 PL 时，空间结构上与 Thr^{47}和 Phe^{43}相邻的 Trp^{52}的吲哚环转 180°，Thr^{47}和 Trp^{52}的位置关系从边对面变成了堆叠(Li *et al.*, 2004)。Maras 等(1999)通过化学修饰的方法发现羊脑 PLK 的 Trp^{52}是结合 ATP 的重要氨基酸残基。

本研究通过序列比对发现与羊脑 PLK 的 Trp^{52}位点对应的家蚕 PLK 的 Ile^{54}并没有吲哚环，所以对 Ile^{54}进行定点突变。当异亮氨酸突变成苯丙氨酸后，突变体的催化活性虽然降低，但幅度不大。证实了家蚕 PLK Ile^{54}和周围的一些氨基酸残基形成疏水环境有利于结合 PL。

3.3　突变体 PLK-R 功能分析

Bach 等(2005)研究发现在激酶家族的 151 种激酶中，PLK 是唯一与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK2/CDK5)拥有同样的选择性抑制剂 roscovitine 的激酶。Tang 等(2005)研究羊脑 PLK 与 roscovitine 形成复合物的结构时发现，roscovitine 的嘌呤环包裹在 Tyr^{84}，Val^{19}，Val^{115}和 Gly^{232}组成的疏水口袋中，roscovitine 的苯甲基和 Val^{41}及 Arg^{86}以疏水键结合，提示这 6 个氨基酸残基对结合 PL 有着重要作用。

本研究通过序列比对发现羊脑 PLK Arg^{86}在家蚕 PLK 的对应位置为 Arg^{88}。推测家蚕 PLK 的 Arg^{88}是结合 PL 的氨基酸残基，所以对 Arg 进行定点突变。当精氨酸突变成异亮氨酸后，突变体的催化活性大幅度降低。结果表示 Arg^{88}确实是结合 PL 的氨基酸残基。Arg^{88}是碱性氨基酸，而 Ile 是中性氨基酸。另一方面，Ile 是疏水性氨基酸，会把自己包埋在周围氨基酸残基中，可能改变 PLK 的蛋白构象。

3.4　突变体 PLK-N 功能分析

人类 PLK Loop Ⅰ上的 Asp^{121}，磷酸化反应时覆盖在 ATP 上，防止 ATP 过早水解(Cao *et al.*, 2006)。羊脑 PLK Loop Ⅰ在 PLK 结合 ATP 后会覆盖在 ATP 结合位点上，防止 ATP 过早水解(Li *et al.*, 2002)。羊脑 PLK Loop Ⅰ的第 121 位是 Asn^{121}，Asn 和 Asp 为酸性氨基酸。

本研究的家蚕 PLK Loop Ⅰ的结构少了 3 个氨基酸残基，但存在 Asn^{121}。因此，推测家蚕 PL 激酶 Asn^{121}有其特殊意义。但非保守的氨基酸残基 Asn^{121}突变后没有改变酶的催化活力。一方面 Asn 和 Glu 都是亲水氨基酸，而且结构相似。所以突变后没有破坏家蚕 PLK Loop Ⅰ的环状结构，从而对家蚕 PLK 的活性影响很小。另一方面 Glu 为酸性氨基酸在磷酸化反应时也能覆盖在 ATP 上，保护 ATP 不被过早水解。本研究推测 Asn^{121}的作用是保护 ATP 不被过早水解。

3.5　突变体 PLK-W 功能分析

羊脑 PLK 中含吲哚环的 Trp^{52}和 Trp^{244}是结合 ATP 的重要氨基酸(Maras *et al.*, 1999)。家蚕在 230 位上和羊、人与猪一样是 Trp，而且在很多对 PLK 晶体研究中也没有提及色氨酸的功能(Li *et al.*, 2002；Lum *et al.*, 2002；Safo *et al.*, 2004；Cao *et al.*, 2006)。

家蚕 PLK 只有第 230 位是 Trp，可能是决定 PLK 催化功能的关键氨基酸。本研究将 Trp^{230}突变

为 Glu 后，突变体丧失催化活性，证明了其重要性。导致酶丧失催化活性可能有三方面的原因：首先 Trp 是疏水性氨基酸，而 Glu 是酸性；其次 Trp 和 Glu 的结构差异太大；还有 Trp 的吲哚环是结合底物重要的官能团，突变后的 PLK 可能不能绑定底物。

参 考 文 献 (References)

Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O, Schmitt S, Baratte B, Koken M, Coburn SP, Tang L, Jiang T, Liang DC, Galons H, Dierick JF, Pinna LA, Meggio F, Totzke F, Schachtele C, Lerman AS, Carnero A, Wan YQ, Gray N, Meijer L, 2005. Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35): 31208-31219.

Cao P, Gong Y, Tang L, Leung YC, Jiang T, 2006. Crystal structure of human pyridoxal kinase. *Journal of Structural Biology*, 154(3): 327-332.

Kästner U, Hallmen C, Wiese M, Leistner E, Drewke C, 2007. The human pyridoxal kinase, a plausible target for ginkgotoxin from *Ginkgo biloba*. *FEBS J.*, 274: 1036-1045.

Kwok F, Churchich JE, 1980. Interaction between pyridoxal kinase and pyridoxine-5-p oxidase, two enzymes involved in the metabolism of vitamin B_6. *Journal of Biological Chemistry*, 255(3): 882-887.

Li MH, Kwok F, Chang WR, Liu SQ, Samuel CL, Zhang JP, Jiang T, Liang DC, 2002. Crystal structure of brain pyridoxal kinase, a novel member of the ribokinase superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48): 46385-46390.

Li MH, Kwok F, Chang WR, Liu SQ, Lo SCL, Zhang JP, Jiang T, Liang DC, 2004. Conformational changes in the reaction of pyridoxal kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17): 17459-17465.

Lum HK, Kwok F, Lo SCL, 2002. Cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* pyridoxal kinase. *Planta*, 215(5): 870-879.

Maras B, Valiante S, Orru S, Simmaco M, Barra D, Churchich JE, 1999. Structure of pyridoxal kinase from sheep brain and role of the tryptophanyl residues. *Journal of Protein Chemistry*, 18(3): 259-268.

McCormick DB, Chen H, 1999. Update on interconversions of vitamin B-6 with its coenzyme. *Journal of Nutrition*, 129(2): 325-327.

Safo MK, Musayev FN, Hunt S, Salvo MLD, Scarsdale N, Schirch V, 2004. Crystal structure of the PdxY protein from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(23): 8074-8082.

Safo MK, Musayev FN, Salvo D, Martino L, Hunt S, Claude JB, Schirch V, 2006. Crystal structure of pyridoxal kinase from the *Escherichia coli* pdxk gene: implications for the classification of pyridoxal kinases. *Journal of Bacteriology*, 188(12): 4542-4552.

Shi RJ, Zhang JY, Jiang CJ, Huang LQ, 2007. *Bombyx mori* pyridoxal kinase cDNA cloning and enzymatic characterization. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(8): 683-690.

Snell EE, Guirard BM, Williams RJ, 1942. Occurrence in natural products of a physiologically active metabolite of pyridoxine. *Journal of Biological Chemistry*, 143(2): 519-530.

Tang L, Li MH, Cao P, Wang F, Chang WR, Bach S, Reinhardt J, Ferandin Y, Galons H, Wan YQ, Gray N, Meijer L, Jiang T, Liang DC, 2005. Crystal structure of pyridoxal kinase in complex with roscovitine and derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35): 31220-31229.

Wada H, Snell EE, 1961. The enzymatic oxidation of pyridoxine and pyridoxamine phosphates. *Journal of Biological Chemistry*, 236(7): 2089-2095.

Wei CL, Jiang CJ, Tao HZ, Wan XC, 2004. Site-directed mutation of violaxanthin de-epoxidase from tea plant (*Camellia sinensis*) *in vitro* and expression, bio-activity assay of the mutants. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 20(1): 73-78. [韦朝领, 江昌俊, 陶汉之, 宛晓春, 2004. 茶树紫黄素脱环氧化酶基因的体外定点突变及其突变体的表达和活性鉴定. 中国生物化学与分子生物学报, 20(1): 73-78]

Zhang JY, Huang LQ, 2003a. Effects of vitamin B_6 deficiency on the amino acid metabolism, fatty acid metabolism and aminotransferase activity of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 46(4): 436-440. [张剑韵, 黄龙全, 2003a. 家蚕体内因缺乏维生素 B_6 而引起的若干代谢变动. 昆虫学报, 46(4): 436-440]

Zhang JY, Huang LQ, 2003b. Distribution, movement and metabolism of vitamin B_6 compounds in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 46(3): 277-281. [张剑韵, 黄龙全, 2003b. 家蚕体内维生素 B_6 的存在形态和转换代谢. 昆虫学报, 46(3): 277-281]

Zhang PP, Zhang JY, Huang LQ, 2010. Fusion expression and purification of pyridoxal kinase of *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 53(9): 957-961. [张平平, 张剑韵, 黄龙全, 2010. 家蚕吡哆醛激酶的融合表达与纯化. 昆虫学报, 53(9): 957-961]

(责任编辑：赵利辉)